

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

2139.17

PATENT APPLICATION



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)	
YUTAKA TAKANO, ET AL.)	Examiner: Not Yet Assigned
Application No.: N/Y/A)	Group Art Unit: N/Y/A
Filed: Currently herewith)	
For: PROCESS FOR PRODUCING)	
PURINE NUCLEOTIDES)	February 1, 2000

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

CLAIM TO PRIORITY

Sir:

Applicants hereby claim priority under the International Convention and all rights to which they are entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following Japanese Priority Application:

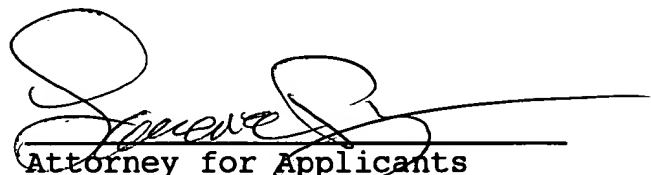
No. 11-029738 filed February 8, 1999.

A certified copy of the priority document is enclosed.

The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of the claim to priority and priority document.

Applicant's undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our below listed address.

Respectfully submitted,


Attorney for Applicants
Lawrence S. Perry
Registration No. 31,865

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

LSP\ac

NY_MAIN 57995 v1

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

1183 US 1



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 2月 8日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第029738号

出願人

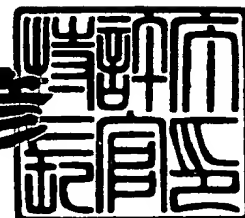
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

1999年12月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3085597

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-1422N2

【提出日】 平成11年 2月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

 【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社
技術研究所内

 【氏名】 高野 裕

【発明者】

 【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社
技術研究所内

 【氏名】 池田 正人

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和醗酵工業株
式会社 本社内

 【氏名】 藤尾 達郎

【特許出願人】

 【識別番号】 000001029

 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

 【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 008187

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プリンヌクレオチドの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできる DNA を導入した微生物を培地に培養し、該培養物中にプリンヌクレオチドの前駆物質を生成蓄積させた後、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素を誘導発現させ、該培養物中に該前駆物質よりプリンヌクレオチドを生成蓄積させ、該培養物中より該プリンヌクレオチドを採取することを特徴とする、プリンヌクレオチドの製造法。

【請求項 2】 プリンヌクレオチドの前駆物質が 5' - キサンチル酸、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素が 5' - キサンチル酸アミナーゼ、プリンヌクレオチドが 5' - グアニル酸である、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】 プリンヌクレオチドの前駆物質がグアノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がグアノシンイノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが 5' - グアニル酸である、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 4】 プリンヌクレオチドの前駆物質がイノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がグアノシンイノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが 5' - イノシン酸である、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 5】 請求項 1 記載の微生物が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、バチルス属からなる属より選ばれる微生物である、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 6】 コリネバクテリウム属に属する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスである、請求項 5 記載の製造法。

【請求項 7】 プリンヌクレオチドを合成可能な酵素が、高温、高 pH および高浸透圧から選ばれる条件に、または糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に

切り替えることにより誘導発現されることを特徴とする、請求項1記載の製造法。

【請求項8】 非糖質系の炭素源が、酢酸または酢酸塩である、請求項7記載の製造法。

【請求項9】 プリンヌクレオチド前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNA。

【請求項10】 高温、高pHおよび高浸透圧から選ばれる条件に、または糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に切り替えることにより、プリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできる、請求項9記載のDNA。

【請求項11】 非糖質系の炭素源が、酢酸または酢酸塩である、請求項10記載のDNA。

【請求項12】 DNAが、pLAC857またはpIGK2である、請求項9または10記載のDNA。

【請求項13】 プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNAを導入した微生物。

【請求項14】 プリンヌクレオチドの前駆物質が5'-キサンチル酸、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素が5'-キサンチル酸アミナーゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、請求項13記載の微生物。

【請求項15】 プリンヌクレオチドの前駆物質がグアノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がグアノシンイノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、請求項13記載の微生物。

【請求項16】 プリンヌクレオチドの前駆物質がイノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がグアノシンイノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-イノシン酸である、請求項13記載の微生物。

【請求項17】 請求項1記載の微生物が、コリネバクテリウム属、エシェ

リヒア属、バチルス属からなる属より選ばれる微生物である、請求項 13 記載の微生物。

【請求項 18】 コリネバクテリウム属に属する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスである、請求項 17 記載の微生物。

【請求項 19】 微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872/pLAC857 (FERM BP-6639) またはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872/pIGK2 (FERM BP6638) である、請求項 18 記載の微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、調味料として大きな需要のあるプリンヌクレオチドの製造法および該製造法に用いることのできる微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】

5'-グアニル酸（以下、GMPと略す）と5'-イノシン酸（以下、IMPと略す）は強い呈味性を示すプリンヌクレオチドであり、化学調味料成分として広く用いられている。

【0003】

これら呈味性ヌクレオチド類の製法として、酵母菌体から抽出したRNAをリボヌクレアーゼP1により加水分解した後に必要な5'-ヌクレオチドを分離精製する方法 [Food Technol., 18, 287 (1964)]、IMPを生産する能力を有する微生物を用いて、IMPを直接発酵生産する方法 [Agricultural and Biological Chemistry, 46, 2557 (1982)]、イノシンやグアノシン等のヌクレオシド類を化学的リン酸化によりヌクレオチドに変換する方法 [Bulletin of the Chemical Society of Japan, 42, 3505 (1969)]、バチルス・メガテリウムの変異株を用いて5-アミノ4-イミダゾールカルボキサミドリボシド（以下、AICARと略す）を発酵法で生産し、AICARから化学的合成法によって製造する方法 [Biotechnol. Bioeng., 9, 329, (1967)、J. Org. Chem., 32, 1825 (1967)]

、5'-キサンチル酸（以下、XMPと略す）生産性のコリネバクテリウム・アンモニアゲネスの変異株を培地に培養してXMPを生成蓄積させ、次いでセルフクローニングによりXMPアミナーゼ（別名GMP合成酵素）活性を強化した大腸菌菌体を培養して酵素源とし、XMPから酵素反応によってGMPを製造する方法[Biosci. Biotech. Biochem., 61, 840 (1997)、特開昭63-233798]等が知られている。

【0004】

以上をまとめると、これまで開発された呈味性ヌクレオチドの生産法は原理的に次の3法に大別できる〔高尾彰一ら編、応用微生物学、文永堂出版（1996）〕。即ち、

- ①酵母RNAを微生物酵素または化学的に分解する方法（RNA分解法）、
- ②糖と窒素源・リン酸源を含む培地で微生物の変異株を培養し、ヌクレオチドを直接生産させる方法（直接発酵法）、
- ③発酵法でヌクレオチド合成の中間体を生産したのち、化学的または酵素的にヌクレオチドに変換する方法（発酵と化学合成または酵素転換の複合プロセス）である。

【0005】

上記①のRNA分解法は、呈味性のプリンヌクレオチドとほぼ等量のピリミジンヌクレオチドが副生してくることから、精製工程は煩雑とならざるを得ない。②の直接発酵法は、一般的にヌクレオチドの膜透過性が障害となるため細胞外に著量のヌクレオチドを生成蓄積できる高生産菌の育種が容易ではなく、経済的に満足のいく生産性を得るのが難しい。特にGMPについては、これまで直接生産については知られていない。ただし、XMPは例外的に著量生成蓄積することが知られている〔高尾彰一ら編、応用微生物学、文永堂出版（1996）〕。そのため、現在、経済的に有利な呈味性ヌクレオチドの製造法として、③の発酵と化学合成または酵素転換との複合プロセスが工業的に広く用いられている。

【0006】

この複合プロセスでは、全体の生産性向上の1つのポイントは、前段の発酵工程におけるヌクレオチド合成中間体の生産収率を高めることにある。従って、X

MP、グアノシンまたはイノシンの高生産微生物が数多く育種されている [Agricultural and Biological Chemistry, 42, 399 (1978)、Agricultural and Biological Chemistry, 43, 1739 (1979)、Agricultural and Biological Chemistry, 46, 2347 (1982)]。

【0007】

後段の工程、即ち化学的または酵素的にヌクレオチドに変換する工程も種々の方法が開発されている。化学的方法としては、部位特異的なリン酸化反応（ヌクレオシド→5'-ヌクレオチド）[Bulletin of the Chemical Society of Japan, 42, 3505 (1969)] が工業的に用いられている。しかしながら、化学的リン酸化反応のためには、リン酸基受容体であるヌクレオシドを必要な純度まで精製する中間工程が必要であり、また、発酵生産に用いた発酵槽とは別の化学反応槽も必要となる。そのため、もう一方の酵素的アミノ化法およびリン酸化法が注目され、種々検討されている。これまでにアミノ化に関してはXMPアミナーゼによる方法が知られている [高尾彰一ら編、応用微生物学、文永堂出版 (1996)]。

【0008】

また、リン酸化については、ホスホトランスフェラーゼ、キナーゼあるいはホスファターゼを利用したリン酸化法が知られており、この中ではキナーゼあるいはホスファターゼを利用した反応がより効率の良い方法として検討されている。例えば、エシェリヒア・コリのグアノシンイノシンキナーゼをコードする遺伝子を導入したエシェリヒア・コリ菌株を用いる5'-ヌクレオチドの製造法 (W091/08286号)、エキシグオバクテリウム・アセチリカムのグアノシンイノシンキナーゼをコードする遺伝子を導入したコリネバクテリウム・アンモニアゲネス菌株を用いる5'-ヌクレオチドの製造法 (W096/30501号)、モルガネラ・モルガニのフォスファターゼ遺伝子にランダム変異を付与した遺伝子を導入したエシェリヒア・コリ菌株を用いる5'-ヌクレオチドの製造法 (特開平9-37785、特開平10-201481)がある。

【0009】

リン酸基供与体としては、種々の化合物が検討されており、例えば、P-ニト

ロフェニルリン酸を用いる方法（特公昭39-2985号）、無機リン酸を用いる方法（特公昭42-1186号、特公昭49-44350号）、ポリリン酸を用いる方法（特開昭53-56390号）、アセチルリン酸を用いる方法（特開昭56-82098号）、A T Pを用いる方法（特開昭63-230094号）、ポリリン酸、フェニルリン酸、カルバミルリン酸を用いる方法（特開平9-37785号）、ピロリン酸を用いる方法（特開平9-37785、特開平10-201481）等が知られている。

【 0 0 1 0 】

しかしながら、これらの方法にあっては使用する基質が高価または不安定であったり、反応副生物が生じるため精製工程が煩雑になる等、工業的に有利な方法とはいえない。このため、経済性を満たす実用的な方法として、微生物が糖代謝の過程で無機リン酸を利用してAMPまたはADPからATPを再生させるATP再生系を利用したヌクレオチド生産システムが開発されている。例えば、XMP生産菌が有しているグルコースを代謝してATPを生合成する活性をATP再生系として用いる方法がある。このATP再生系と、XMPおよびATPからGMPを生成する能力を持つ微生物のXMPアミナーゼ活性を共役させることによって、ATPの代わりに安価なグルコースと無機リン酸をATP再生基質とするGMPの製法がある[Biosci. Biotech. Biochem., 61, 840, (1997)]。また、この方法で、酵素としてイノシンキナーゼを利用するIMPの製造法もある（特開昭63-230094）。

【 0 0 1 1 】

直接発酵によりXMP、グアノシンまたはイノシンを生産させる発酵工程と、それら発酵産物を酵素的にGMPまたはIMPに転換する反応工程からなるGMPまたはIMPの製造プロセスでは、2種の微生物が用いられる。

即ち、前段の発酵工程では、XMP、グアノシンまたはイノシンの生産菌として育種された変異株が用いられる。後段のアミノ化またはリン酸化を行う反応工程では、XMPアミナーゼ活性またはグアノシンイノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を高発現化させた微生物が用いられる。

【 0 0 1 2 】

後段の反応において必要となるATPは、後段の転換菌だけでなく、発酵を終

了した前段の生産菌が有しているATP再生活性が利用される。

従って、後段の反応工程はXMPアミナーゼ活性またはグアノシンイノシンキナーゼ活性とATP再生活性を2菌体間で共役させたシステムとなっている。

【0013】

全体のプロセスの概要は、以下の通りである。

まず大型発酵槽で生産菌を糖質と窒素源を主原料とする培地に培養してXMP、グアノシンまたはイノシンを生成蓄積させる。一方、別の小型発酵槽で転換菌を培養する。前段の発酵が終了した時点で、この大型発酵槽に別に培養した転換菌を添加して、安価なエネルギー供与体およびリン酸基供与体存在下でリン酸化またはアミノ化反応を行う。

【0014】

以上のような酵素反応による製造プロセスは、化学的にリン酸化を行う方法に比べ前述の理由により有利であるものの、転換菌を培養するための小型発酵槽が必要である、転換菌を添加する分、前段の発酵工程での液量を減らす必要があり、したがって目的ヌクレオチドのバッチ当たりの得量が低下する等の点で十分に効率的なプロセスとはいえない。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、同一発酵槽内で効率よくプリンヌクレオチドを製造するためのプロセスの開発を課題とする。

【0016】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素の遺伝子を、プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有する発酵菌に保有させ、その発現を発酵工程および反応工程の両工程間で制御できれば、一微生物のみで、プリンヌクレオチドの前駆物質の発酵に引き続いて、該前駆物質よりプリンヌクレオチドの転換反応を一つの発酵槽内で行うことが可能な、より優れたプリンヌクレオチドの製造プロセスになる可能性があると考え、鋭意検討を重ねた。その結果、本発明を完成するに至った。

【0017】

即ち、本発明は以下(1)～(13)に関する。

(1) プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNAを導入した微生物を培地に培養し、該培養物中にプリンヌクレオチドの前駆物質を生成蓄積させた後、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素を誘導発現させ、該培養物中に該前駆物質よりプリンヌクレオチドを生成蓄積させ、該培養物中より該プリンヌクレオチドを採取することを特徴とする、プリンヌクレオチドの製造法。

【0018】

(2) プリンヌクレオチドの前駆物質が5'-キサンチル酸、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素が5'-キサンチル酸アミナーゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、上記(1)記載の製造法。

(3) プリンヌクレオチドの前駆物質がグアノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がグアノシンイノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、上記(1)記載の製造法。

【0019】

(4) プリンヌクレオチドの前駆物質がイノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がグアノシンイノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-イノシン酸である、上記(1)記載の製造法。

(5) 上記(1)記載の微生物が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、バチルス属からなる属より選ばれる微生物である、上記(1)記載の製造法。

【0020】

(6) コリネバクテリウム属に属する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスである、上記(1)記載の製造法。

(7) プリンヌクレオチドを合成可能な酵素が、高温、高pHおよび高浸透圧から選ばれる条件に、または糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に切り替える

ことにより誘導発現されることを特徴とする、上記（１）記載の製造法。

【0021】

（８） 非糖質系の炭素源が、酢酸または酢酸塩である、上記（７）記載の製造法。

（９） プリンヌクレオチド前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNA。

【0022】

（１０） 高温、高pHおよび高浸透圧から選ばれる条件に、または糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に切り替えることにより、プリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできる、上記（９）記載のDNA。

（１１） 非糖質系の炭素源が、酢酸または酢酸塩である、上記（１０）記載のDNA。

【0023】

（１２） DNAが、pLAC857またはpIGK2である、上記（９）または（１０）記載のDNA。

（１３） プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNAを導入した微生物。

【0024】

（１４） プリンヌクレオチドの前駆物質が5'-キサンチル酸、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素が5'-キサンチル酸アミナーゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、上記（１３）記載の微生物。

（１５） プリンヌクレオチドの前駆物質がグアノシン、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素がグアノシンイノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-グアニル酸である、上記（１３）記載の微生物。

【0025】

（１６） プリンヌクレオチドの前駆物質がイノシン、該前駆物質よりプリンヌ

クレオチドを合成することのできる酵素がグアノシンイノシンキナーゼまたはホスファターゼ、プリンヌクレオチドが5'-イノシン酸である、上記(13)記載の微生物。

(17) 請求項1記載の微生物が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、バチルス属からなる属より選ばれる微生物である、上記(13)記載の微生物。

【0026】

(18) コリネバクテリウム属に属する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスである、上記(17)記載の微生物。

(19) 微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872 / pLAC 857 (FERM BP-6639) またはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872 / pIGK 2 (FERM BP-6638) である、上記(18)記載の微生物。

以下に本発明を詳細に説明する。

【0027】

【発明の実施の形態】

本発明は、直接発酵によりプリンヌクレオチドの前駆物質を生産させる発酵工程と、該発酵工程で生産された前駆物質を酵素的にプリンヌクレオチドに転換する反応工程を単一の微生物を用いて一つの発酵槽内で連続的に行うプロセスである。

【0028】

該プロセスを成立させるために、本発明者らが見出した重要な要件は以下の3点である。

即ち、第1に、直接発酵によりプリンヌクレオチドの前駆物質を生産させる発酵工程では、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子の発現が発酵に実質的に影響を及ぼさないレベルに抑えられていること。

【0029】

該酵素の発現が抑えられない場合には、該酵素の活性により、発酵中に細胞内にプリンヌクレオチドが生成蓄積し、下記理由により発酵収率が低下する。

プリンヌクレオチドとして、GMPが蓄積した場合には、プリン生合成経路上の鍵酵素のフィードバック制御が誘発され、XMPの生産が止まってしまう。IMPが蓄積した場合には、イノシン生成との間で無益サイクル(Futile cycle)が形成され、ATPの浪費が起こる。このように、細胞内でのプリンヌクレオチドの生成蓄積は発酵収率の低下を招くことになり、経済的に不利となる。

【0030】

第2に、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する反応工程においては、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素活性が十分に誘導されること。

第3に、発酵を終えかつ誘導処理を施した生産菌に十分なATP再生活性と転換反応にあずかるリン酸化またはアミノ化活性が保持され、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する反応工程においてそれが十分に機能すること。

【0031】

以上の3点である。

本発明に用いられる微生物は、プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ、ATP再生活性を持つ微生物であれば、野生株、変異株、細胞融合株、形質導入株あるいは組換えDNA技術を用いて造成した組換え株のいずれであっても特に限定されない。該微生物として、好適には、核酸発酵やアミノ酸発酵に用いられているコリネバクテリウム属、エシェリヒア属、バチルス属に属する微生物をあげることができる。強力なATP再生活性を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスは、更に好適な微生物としてあげることができる。

【0032】

プリンヌクレオチドの前駆物質としては、XMP、グアノシン、イノシン、アデノシン等をあげることができる。

ATP再生活性とは、微生物が糖質をエネルギー供与基質として代謝する過程で無機リン酸を利用してAMPもしくはADPからATPを再生させる活性のことをいう。このATP再生系は、解糖系、TCAサイクル、電子伝達系等の糖代謝系およびエネルギー代謝系の一部であり、ほとんどあらゆる微生物がその活性

を有している。

【 0 0 3 3 】

本発明に用いられる微生物の具体例としては、例えば以下の菌株およびこれらから誘導された変異株をあげることができる。

【 0 0 3 4 】

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21295

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21477

コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 13032

コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 14067

コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 13869

エシェリヒア・コリ ATCC 14948

エシェリヒア・コリ ATCC 11303

エシェリヒア・コリ ATCC 9637

バチルス・サチルス ATCC 14618

【 0 0 3 5 】

本発明に用いられるプリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素としては、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素であればいずれも用いることができ、XMPアミナーゼ、グアノシンイノシンキナーゼ、ホスファターゼ、アデニレートキナーゼ等をあげることができる。

【 0 0 3 6 】

これら酵素をコードするDNAとして、例えば、以下のものをあげることができる。

XMPアミナーゼをコードする遺伝子として、エシェリヒア・コリに由来するもの [Nucleic Acids Res., 13, 1303 (1985)]、バチルス・サチリスに由来するもの [Nucleic Acids Res., 18, 6710 (1990)]、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに由来するもの等をあげることができる。

【 0 0 3 7 】

グアノシンイノシンキナーゼをコードする遺伝子として、エシェリヒア・コリに由来するもの（W091/08286号）、エキシオバクテリウム・アセチリカムに由来するもの（W096/30501号）等をあげることができる。

ホスファターゼをコードする遺伝子としてモルガネラ・モルガニに由来するもの（特開平9-37785、特開平10-201481）等をあげることができる。

アデニレートキナーゼをコードする遺伝子としてサッカロミセス・セレピシエに由来するもの〔J. Biol. Chem., 263, 19468 (1988)〕をあげることができる。

【 0 0 3 8 】

プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子は、公知の方法により取得することができる。

例えば、XMPアミナーゼをコードする遺伝子の場合には、XMPアミナーゼ構造遺伝子の配列の両末端に位置する配列をもとにプライマーを合成する。ついで本プライマーとエシェリヒア・コリ染色体DNA、バチルス・サチリス染色体DNAまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス染色体DNAからポリメラーゼ・チェーン・リアクション法（PCR法）によりXMPアミナーゼ構造遺伝子を取得できる。

【 0 0 3 9 】

グアノシンイノシンキナーゼをコードする遺伝子の場合には、グアノシンイノシンキナーゼ構造遺伝子の配列の両末端に位置する配列をもとに合成したプライマーとエシェリヒア・コリ染色体DNAまたはエキシオバクテリウム・アセチリカム染色体DNAからPCR法によりグアノシンイノシンキナーゼ構造遺伝子を取得できる。同様にサッカロミセス・セレピシエ染色体DNAからPCR法によりアデニレートキナーゼ構造遺伝子を取得できる。同様に、PCR法を用いることでモルガネラ・モルガニ染色体DNAからホスファターゼ構造遺伝子を、またサッカロミセス・セレピシエ染色体DNAからアデニレートキナーゼ構造遺伝子を取得できる。

【 0 0 4 0 】

このようにして取得されたプリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオ

チドを合成可能な酵素をコードする遺伝子を適当な誘導発現ベクターの誘導発現制御が可能な転写・翻訳シグナルの支配下に配することにより、該遺伝子の発現を制御できる組換え体プラスミドを得ることができる。

【0041】

誘導発現ベクターとしては、用いる微生物内で複製可能であると同時に、以下の3条件を満たせば特に限定されるものではない。

第1に、直接発酵によりプリンヌクレオチドの前駆物質を生産させる発酵工程では、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子の発現を発酵に実質的に影響を及ぼさないレベルに抑えられること。

【0042】

第2に、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する反応工程に移行する前に行う誘導処理によって、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素の活性を十分に誘導できること。

第3に、該誘導方法が、誘導処理後も生産菌に十分なATP再生活性と転換活性が保持されるような方法であること。

【0043】

上記3条件を満たすベクターとして、例えば、 P_L プロモーター/ $cI857$ リプレッサー遺伝子を保有し、高温で誘導される $pPAC31$ (W098/12343号)、 lac プロモーター/ $lacI_{ts}$ リプレッサー遺伝子を保有し、高温で誘導される $pBB1$ [Gene, 70, 415 (1988)]、 P_L プロモーター/ $cI857$ リプレッサー遺伝子を保有し、高pHで誘導される $pRK248cIts$ [Gene, 97, 125 (1991)]、 $prou$ 発現制御領域を保有し、高浸透圧下で誘導される $pOSEX2$ [Gene, 151, 137 (1994)]、 trc プロモーター/ $lacI^q$ リプレッサー遺伝子を保有し、イソプロピル- β -D-チオガラクトシド (IPTG) で誘導される $pTrc99A$ [Gene, 69, 301 (1988)]、 $araBAD$ プロモーター/ $araC$ リプレッサー遺伝子を保有し、L-アラビノースで誘導される $pAL9181$ [Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 205 (1992)]、糖質系の炭素源から非糖質系の炭素源に切り替えることで誘導されるベクター等のエシェリヒア・コリで構築されている誘導発現ベクターをあげるこ

とができる。

【 0 0 4 4 】

更に、これら誘導発現ベクター上の、発現制御に関わる転写・翻訳シグナル領域が、変異技術または組換えDNA技術で改変されたベクターも、同様に用いることができる。

これら既知の誘導発現ベクターあるいは、それらから更に改良されたベクターを、大腸菌以外の宿主で利用する場合には、該宿主で機能する複製起点を挿入すればよい。例えばコリネバクテリウム・アンモニアゲネスで利用する場合には、該ベクターにコリネバクテリウム・アンモニアゲネスで機能するコリネバクテリウム・グルタミカム由来のプラスミドが有する複製起点等を挿入すればよい。

【 0 0 4 5 】

コリネバクテリウム・グルタミカム由来のプラスミドとしては、例えば p C G 1 (特開昭57-134500号)、p C G 2 (特開昭58-35197号)、p C G 4 (特開昭57-183799号)、P A M 3 3 0 (特開昭58-67699号)、p A G 1、p A G 3、p A G 1 4、p A G 5 0 (特開昭62-166890号) があげられる。

【 0 0 4 6 】

コリネバクテリウムにおいて、温度を上昇させることにより誘導可能なベクター p L A C 8 5 7、酢酸等の非糖質炭素源で誘導可能なベクター p C E X 2 (特開平3-224259号) 等を好適なベクターとしてあげることができる。

一方、これらの誘導発現ベクター上の遺伝子発現制御に関わる転写・翻訳シグナルが、用いる微生物内で機能しないか、機能しても上記3つの要件を十分に満たさない場合には、該転写・翻訳シグナル領域を、変異技術または組換えDNA技術を用いて、上記3つの要件を十分満たすように改良するか、該微生物に適用可能な誘導発現システムを新たに開発する必要がある。前者の場合には、用いる微生物で既に知られている転写・翻訳シグナル配列を参考にして、例えば、サイト・ダイレクト・ミューテーション(Site direct mutation)などの方法により実施することができる。後者の場合には、エシェリヒア・コリ等で構築された上述のような一般的な誘導発現システムの開発方法に準じ開発構築することができる。

【0047】

誘導発現系を備えた微生物として、好適には、温度で発現を制御できる p P A C 3 1、または安価な酢酸の添加で発現を制御できる p C E X 2 を遺伝子誘導発現システムとして用いて造成したコリネバクテリウム・アンモニアゲネス等をあげることができる。

【0048】

本発明では、上記 3 条件を満たせば、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子がベクタープラスミド上に存在しても、染色体に組み込まれていても問題ではない。即ち、該遺伝子の発現が所望のように制御可能であれば、プラスミドの保有株、遺伝子の染色体組込み株のいずれであっても特に限定されない。

【0049】

プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子を含有する誘導発現プラスミドをプリンヌクレオチドの前駆物質を生産する微生物に導入する方法として、プロトプラスト法、電気パルス法、塩化カルシウム法、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す) 等に記載の、通常使用される方法をあげることができる。

【0050】

例えば、宿主菌としてコリネバクテリウム属細菌を用いる場合には、プロトプラスト法 (特開昭57-183799号)、電気パルス法 (特開平2-207791号) が特に有効である。宿主菌としてエシェリヒア・コリを用いる場合には、塩化カルシウム法 [J.Mol.Biol., 53, 159 (1970)] 等も用いることができる。

【0051】

このようにして得られたプリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子を導入した本発明の形質転換体を、炭素源、窒素源、無機塩類、更に必要に応じて有機微量栄養素を含有する通常の培地で培養し、プリンヌクレオチドの前駆物質を生成蓄積後、熱処理または酢酸添加等の誘導処理を施すことにより、プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌク

レオチドを合成可能な酵素を誘導発現できる。

【0052】

上記発酵工程で用いられる培地の炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜、廃糖蜜、澱粉加水分解物等の炭水化物、エタノール、グリセリン、ソルビトール等のアルコール類、ピルビン酸、乳酸等の有機酸、グリシン、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸等、該微生物が資化可能であるものであればいずれも使用できる。これらの使用濃度は、5～30%が好ましい。

【0053】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機および有機アンモニウム塩、尿素、各種アミノ酸、ペプトン、NZアミン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミール又はその消化物等の種々のものを使用できる。

【0054】

無機物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、炭酸カルシウム等を用いることができる。

用いる微生物がアミノ酸、核酸、ビタミン等特定の栄養物質を生育に要求する場合には、培地にこれら物質を適量添加する。

【0055】

培養は、浸透培養または通気攪拌培養等の好気条件下に行う。培養温度は一般に26℃～37℃が最適である。培養期間は、通常1日～5日間である。

プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素をコードする遺伝子を発現させるための誘導処理条件としては、例えば、pPAC31またはpBB1を利用する場合には、通気攪拌条件下、37℃～42℃で1～24時間、pRK248cItsを利用する場合には、pH9で1～24時間、pOSEX2を利用する場合には、50mM～300mM NaCl存在下で1～24時間、pTrc99Aを利用する場合には0.1mM～0.5mM IP

TG存在下で1～24時間、pAL9181を利用する場合には0.2% L-アラビノース添加条件下で1～24時間、pCEX2を用いる場合には0.1%～2% 酢酸アンモニウムまたは酢酸ナトリウム添加条件下で1～24時間、処理することが望ましい。

【0056】

プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する反応工程において、界面活性剤を添加することが好ましい。

該界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ステアリルアミン（例えばナイミンS-215日本油脂社製）、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイド、カチオンFB、カチオンF2-40E等のカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド硫酸、ニューレックスTAB、ラピゾール80等のアニオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタル・モノステアレート（例えばノニオンST221）等の両性界面活性剤等、プリンヌクレオチドの細胞膜透過を促進するのが好ましい。該界面活性剤は、通常0.1～50mg/ml、好ましくは1～20mg/mlの濃度で用いられる。

【0057】

プリンヌクレオチドの前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成する工程の反応は、pH6～8に調整し、温度20～40℃に保ち1～48時間行う。

反応終了後、反応液中に生成蓄積したプリンヌクレオチドを採取する方法は、菌体を除去して濃縮晶析する方法、活性炭処理法、あるいはイオン交換樹脂法等の公知の方法により実施できる〔遠藤 勲ら、化学工学会（編）「バイオセパレーションプロセス便覧」、共立出版（1996）〕。

【0058】

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。遺伝子工学的手法は断らない限り、モレキュラー・クローニング第2版記載の方法に準じて行った。

【実施例】

【0059】

実施例1 P_L プロモーター支配下にエシェリヒア・コリのXMPアミナーゼ遺

伝子を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのXMP生産菌の造成および該微生物によるGMPの生産

(1) XMPアミナーゼ遺伝子の発現を温度によって制御可能な誘導発現プラスミドpLAC857の造成

熱誘導発現プラスミドpLAC857は、公知のプラスミドpPLA66から以下の2つのステップを経て構築した。pPLA66は、 P_L プロモーターおよびtrpLのSD配列の下流にXMPアミナーゼ遺伝子を連結することにより造成されたXMPアミナーゼの高発現プラスミドである[Biosci. Biotech. Biochem., 61, 840 (1997)]。

【0060】

温度感受性リプレッサー遺伝子cI857をプラスミドpPLA66へ、以下の方法で挿入した。

pPLA66 1 μ gをEcoRI (5単位) およびBglII (5単位) で切断した。該切断物をアガロースゲル電気泳動法で分離し、 P_L プロモーターおよびエシェリヒア・コリ由来のXMPアミナーゼ遺伝子(guaA遺伝子)部分を含むDNA断片をQIAGEN社製QIAEXIIを用いてゲルから回収した。

cI857遺伝子を含有するプラスミドpPAC31 (WO98/12343号) 1 μ gをEcoRI (5単位) およびBamHI (5単位) で切断した。該切断物をアガロースゲル電気泳動で分離し、cI857遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子およびエシェリヒア・コリ由来の複製起点を含有するDNA断片をゲルから回収した。

【0061】

該遺伝子を含有するDNA断片と先に調製したguaA遺伝子を含有するDNA断片を宝酒造社製のライゲーションキットを用いて連結処理した。

該連結処理液を用いてエシェリヒア・コリJM109(宝酒造社製)を形質転換後、100 μ g/mlアンピシリンを含むL寒天培地上に塗布し、アンピシリンに耐性となった形質転換体を得た。

【0062】

得られた形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。

該プラスミドを各種制限酵素で切断解析した結果、 P_L プロモーター支配下に連結されたXMPアミナーゼ遺伝子、 $cI857$ 遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子およびエシェリヒア・コリ由来の複製起点からなる構造を有するプラスミド $pLA857$ を取得した。

【0063】

該 $pLA857$ へ、コリネバクテリウム由来の複製起点を、以下の方法で挿入した。

$pLA857$ $1\mu g$ を本プラスミド上に唯一存在する $Pst1$ (5単位) で切断し、該切断物をアガロースゲル電気泳動法で分離し、ゲルから回収し、 $pLA857$ の $Pst1$ 切断物を取得した。

【0064】

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスで複製可能なプラスミドベクター $pCG116$ (特開平1-265892号) $1\mu g$ を $Pst1$ (5単位) で切断し、再結合を防止するためアルカリホスファターゼ処理によるDNAの脱リン酸化後、フェノール抽出処理、エタノール沈殿を行い、 $pCG116$ の $Pst1$ 切断物を取得した。

【0065】

上記で取得した、 $pLA857$ の $Pst1$ 切断物と $pCG116$ の $Pst1$ 切断物をライゲーションキット (同上) を用いて連結処理した。

該連結処理により取得したDNA $1\mu g$ を使い、電気パルス法 [Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 283 (1989)] によってコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 6872株を形質転換し、スペクチノマイシン $100\mu g/ml$ を含むA寒天培地 [グルコース 0.5%、ペプトン 1%、肉エキス 0.5%、酵母エキス 0.5%、塩化ナトリウム 0.25%、アデニン $10mg/l$ 、グアニン $10mg/l$ (pH 7.2)] に塗布した。

【0066】

スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。

該プラスミドを各種制限酵素で切断解析し、得られた形質転換株が図1に示し

た目的の構造を有するプラスミドpLAC857を保有していることを確認した。

【0067】

pLAC857を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872/pLAC857はブダペスト条約に基づいて、平成11年2月5日付けで工業技術院生命工学技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-0046）にFERM BP-6689として寄託されている。

【0068】

(2) FERM BP-1261株にpLAC857を導入した株の有するXMPアミナーゼ活性の測定

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872/pLAC857 (FERM BP-6689) からアルカリ溶菌法によりpLAC857を抽出した。

【0069】

該プラスミドを用い、電気パルス法（上記）によってコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのXMP生産菌FERM BP-1261（特許番号第2618383号：アデニンのリーキー要求性およびグアニン要求性）を形質転換した。

スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。

【0070】

該プラスミドを各種制限酵素で切断解析し、得られた形質転換株がpLAC857を保有していることを確認した。

pLAC857を有するXMP生産菌FERM BP-1261株を、スペクチノマイシン100 μ g/mlを含むA寒天培地で、30℃および37℃条件下、24時間培養した。

【0071】

培養後、遠心分離により菌体を取得した。

該菌体を100mM Tris-HCl (pH7.0) で2回洗浄後、同緩衝液10mlに懸濁した。

該菌体懸濁液にガラスビーズ（シンマルエンタープライゼス社製0.1~0.2φ）10gを添加し、氷冷しながらホモゲナイザー（日本精機社製）で10分間破碎処理した。

【0072】

得られた処理液を4℃にて10分間遠心（14000×g）し、上清を細胞抽出液として回収した。

予め42℃に保温した細胞抽出液を添加した反応液〔160mM Tris-HCl（pH8.6）、12mM ATP Na₂ 3H₂O、16mM MgSO₄ 7H₂O、40mM（NH₄）₂SO₄〕1.15mlに0.1mlの0.3M XMPを加えて42℃で反応を開始した。15分後に、反応液に3.9mlの3.5%過塩素酸を加えて反応を停止させた。

【0073】

該反応停止液を、3000rpmで10分間遠心分離後、上清の290nmにおける吸光度を測定した。1分間に1μmolのGMPを生成させる活性を1単位（U）とし、蛋白質1mg当たりの比活性を算出した。蛋白量は、プロテイン・アッセイキット（バイオラッド社製）を用いて定量した。

【0074】

結果を第1表に示した。30℃で培養した菌体では活性が検出されなかったのに対し、37℃で培養した菌体では活性が検出された。本結果は、pLAC857を有するFERM BP-1261株において、XMPアミナーゼ遺伝子の発現がP_Lプロモーターの支配下にあり、該酵素活性を温度によって制御できることを示している。

【0075】

【表 1】

第 1 表

培養温度	比活性 (μ mol/min/mg protein)
30℃	検出されず
37℃	0.25

【0076】

(3) pLAC857を有するXMP生産菌FERM BP-1261株によるGMPの生産

pLAC857を有するFERM BP-1261株をストレプトマイシン20 μ g/mlを含有するA寒天培地上で30℃、2日間培養後、得られた菌体をストレプトマイシン20 μ g/mlを含有する60mlのCシード培地〔グルコース 5%、酵母エキス 1%、ペプトン 1%、NaCl 0.25%、尿素 0.3%、アデニン 150mg/l、グアニン 150mg/l (pH7.2)〕を添加した250ml容三角フラスコに植菌し、30℃、24時間浸とう培養した。

【0077】

得られた培養液全量を、0.94LのDシード培地〔グルコース 8.8%、肉エキス 1.7%、ペプトン 1.7%、 KH_2PO_4 0.167%、 K_2HPO_4 0.167%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.167%、アデニン 333mg/l、グアニン 350mg/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 33mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6.7mg/l、 β -アラニン 25mg/l、L-システイン 33mg/l、ビオチン 167 μ g/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.3mg/l、チアミン 8.3mg/l (pH7.2)〕を添加した2L容発酵槽に植菌し、5.5Mアンモニア水でpHを7.2に保ちつつ、30℃、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で24時間培養を行った。

【0078】

得られた培養液 120 ml を、0.88 L の F 発酵培地〔グルコース 8%、オルソリン酸 1.67%、KOH 1.29%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 123 mg/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24.6 mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 12.3 mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.3 mg/l、 β -アラニン 18.5 mg/l、L-システイン 24.6 mg/l、ニコチン酸アミド 6.2 mg/l、ヒスチジン 24.6 mg/l、ビオチン 185 μg /l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mg/l、アデニン 203 mg/l、グアニン 10 mg/l (pH 7.2)] を添加した 2 L 容発酵槽に植菌し、5.5 M アンモニア水で pH 7.2 に保ちつつ、28℃、攪拌 600 rpm、通気 1 L/min の条件で 44 時間培養を行った。

【0079】

培養終了後の、培地上清中の XMP および GMP の蓄積量を、HPLC を用いて次のようにして定量した。

HPLC 分析

カラム：Asahipak GS-320H (旭化成社製)

溶出液：0.2 M NaH_2PO_4 (pH 3.0)

流速：1 ml/min

検出：UV 254 nm

XMP および GMP の蓄積量は、UV 254 nm の吸光度により測定し、吸光強度をスタンダードと比較することにより定量した。

【0080】

HPLC 分析の結果、XMP は 27.2 g/l 生成蓄積していたが、GMP は検出されなかった。

XMP アミナーゼ遺伝子を誘導発現させるために、培養ブロス を 40℃ に昇温し 5.5 M アンモニア水で pH 7.2 に保ちつつ、攪拌 600 rpm、通気 1 L/min の条件で 6 時間熱処理を行った。

【0081】

該熱誘導処理を施した XMP の発酵液に、グルコース 2.5%、フィチン酸 10 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.4 g/l、 Na_2HPO_4 9.36 g/l

、アデニン 96.9 mg/l、ナイミーン S-215 10 g/l を添加した後、5.5 M アンモニア水で pH を 7.4 に保ちつつ、40℃、攪拌 600 rpm、通気 1 L/min の条件で 24 時間反応を行った。

反応後、培地上清中の GMP の蓄積量を、上記 HPLC 分析条件で定量した。HPLC 分析の結果、20.8 g/l の GMP の生成蓄積が認められた。

【0082】

実施例 2 イソシトレートリアーゼ遺伝子のプロモーター支配下にコリネバクテリウム・アンモニアゲネスの XMP アミナーゼ遺伝子を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスの XMP 生産菌の造成および該微生物による GMP の生産

(1) PCR 法による XMP アミナーゼ遺伝子の増幅とクローニング

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスの XMP アミナーゼ遺伝子の単離は、塩基配列に基づき PCR 法により、次のようにして行った。

【0083】

まず、XMP アミナーゼ遺伝子の両末端に位置し、それぞれ制限酵素 A f l I、B a m H 1 切断部位を有する配列番号 1 および 2 に示すオリゴヌクレオチドを合成した。また、鋳型とするコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872 の染色体 DNA の調整は、グリシン存在下で培養した菌体をリゾチームとアクロモペプチダーゼ処理し、プロトプラストを調製する方法（特開平 6-225776）に従って行った。

【0084】

染色体 DNA 0.1 μ g とプライマーとして該オリゴヌクレオチド 0.25 μ M および タック DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）2.5 ユニットを dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 200 μ M、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウムおよび 0.0001%ゼラチンを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.3）0.1 ml に添加し、PCR を行った。

【0085】

PCR は、94℃で 90 秒間、50℃で 120 秒間、72℃で 120 秒間の反応を 1 サイクルとして、10 サイクル繰り返し、94℃で 90 秒間、40℃で 120 秒間、72℃で 120 秒間の反応を 1 サイクルとして、10 サイクル繰り返

し、更に、94℃で90秒間、40℃で120秒間、72℃で180秒間の反応を1サイクルとして、20サイクル繰り返した後、72℃で360秒間反応する条件で行った。

【0086】

得られた反応液を用い、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とする約1.6 kbのDNA断片を回収した。

該DNA断片を制限酵素A f l I I（5単位）およびB a m H I（5単位）で切断し、DNA断片の両端がA f l I IまたはB a m H Iで処理された約1.6 kbの切断物をアガロースゲル電気泳動法により分離、回収した。

【0087】

(2) XMPアミナーゼ遺伝子の発現を炭素源によって制御可能な誘導発現プラスミドpGUA2の造成

誘導発現ベクターpCEX2（特開平3-224259号）を用い、XMPアミナーゼ遺伝子の発現を炭素源によって制御できるプラスミドを、以下のようにして構築した。

【0088】

pCEX2は、コリネバクテリウム・グルタミカムのイソシトレートリアーゼ遺伝子の発現制御領域および転写終結シグナル配列を含むベクターで、マルチクローニング部位に挿入された外来遺伝子の発現は、糖質存在下では抑制され、酢酸等の非糖質存在下で誘導される。

【0089】

pCEX2ベクターDNA 1 μ gをA f l I I（0.5単位）で部分切断した後、B a m H I（5単位）で切断し、イソシトレートリアーゼ遺伝子の発現制御領域、転写終了シグナル領域、スペクチノマイシン耐性遺伝子およびコリネバクテリウム・グルタミカム由来の複製起点を含む7.6 kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離、回収した。

【0090】

該DNA断片と上記実施例2（1）で取得したXMPアミナーゼ遺伝子のPCR増幅断片を連結処理し、連結DNAを取得した。

該連結DNA 1 μ gを用い、電気パルス法を用いてコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 6872株を形質転換し、スペクチノマイシン100 μ g/mlを含むA寒天培地に塗布した。

【0091】

スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。

該プラスミドDNAを各種制限酵素で切断解析し、得られた形質転換株が図2に示した目的の構造を有するプラスミドpGUA2を有することを確認した。

【0092】

(3) FERM BP-1261株にpGUA2を導入した株の有するXMPアミナーゼ活性の測定

pGUA2を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 6872株からアルカリ溶菌法によりpGUA2を抽出した。

【0093】

該プラスミドを用い、電気パルス法によってコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのXMP生産菌FERM BP-1261（アデニンのリーキー要求性およびグアニン要求性）を形質転換した。

スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを抽出した。

【0094】

該プラスミドを各種制限酵素で切断解析した結果、形質転換株がpGUA2を保有していることを確認した。

pGUA2を有するXMP生産菌FERM BP-1261株を、スペクチノマイシン100 μ g/mlを含むA培地および該培地のグルコースを酢酸アンモニウムに代替した培地の2種類の培地で、30℃にて24時間培養した。

【0095】

得られた培養液から、それぞれ菌体を取得し、実施例1（2）と同様にして細胞抽出液を調製した。

これら抽出液を用い、これら抽出液中のXMPアミナーゼ活性を実施例1（2）

)に記載の方法に準じて測定した。

【0096】

結果を第2表に示した。

グルコースを炭素源として培養した菌体では、極めて低レベルの活性しか検出されなかったのに対し、2% 酢酸アンモニウムを炭素源として培養した菌体では高レベルの活性が検出された。

【0097】

該結果は、pGUA2を有するFERM BP-1261株において、XMPアミナーゼ遺伝子の発現がイソシトレートリアーゼ遺伝子のプロモーター支配下にあり、該酵素活性を炭素源によって制御できることを示している。

【0098】

【表2】

第 2 表

炭素源	比活性 (μ mol/min/mg protein)
グルコース	0.05
酢酸アンモニウム	0.38

【0099】

(4) XMP生産菌FERM BP-1261株にpGUA2を導入した株によるGMPの生産

pGUA2を有するFERM BP-1261株を用い、実施例1(3)と同様な培養条件でXMP発酵を行った。培養終了後の培地上清中のXMPおよびGMPの生成蓄積量を実施例1(3)と同様な方法により定量した。

【0100】

その結果、XMPの蓄積量は、18.4 g/lであった。GMPは検出されなかった。

発酵終了後、XMPアミナーゼ遺伝子を誘導発現させるために、酢酸アンモニ

ウムを最終濃度が2%になるように添加し、5.5M アンモニア水でpH7.2に保ちつつ、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で10時間培養を継続した。

【0101】

酢酸アンモニウム存在下で誘導処理を施した該培養液に、グルコース 2.5%、フィチン酸 10g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.4g/l、 Na_2HPO_4 9.36g/l、アデニン 96.9mg/l、ナイミーンS-215 10g/lを添加した後、5.5M アンモニア水でpHを7.4に保ちつつ、40℃、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で24時間反応を行った。

【0102】

反応後、該反応液の培地上清中のGMPの蓄積量を実施例1(3)に記載の方法に準じて定量した。

該反応液に、GMPは14.4g/lの生成蓄積されていた。

【0103】

実施例3 イソシトレートリアーゼ遺伝子のプロモーター支配下にエシェリヒア・コリのグアノシンイノシンキナーゼ遺伝子を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのイノシン生産菌の造成および該微生物によるIMPの生産

(1)PCR法によるグアノシンイノシンキナーゼ遺伝子の増幅とクローニング

エシェリヒア・コリのグアノシンイノシンキナーゼ遺伝子の単離は、公知の塩基配列(WO91/08286号)に基づきPCR法により、次のようにして行った。

【0104】

グアノシンイノシンキナーゼ遺伝子の両末端に位置し、それぞれ制限酵素AflIIIおよびBamHI切断部位を有する配列番号3および4に示すオリゴヌクレオチドを合成した。

グアノシンイノシンキナーゼ遺伝子の鋳型として、エシェリヒア・コリHM70/pBM2株(WO91/08286号)が保有するプラスミドpBM2を用いた。

【0105】

該プラスミドDNA 0.1 μ g とプライマーとして該オリゴヌクレオチド 0.25 μ M およびタックDNAポリメラーゼ（宝酒造社製）2.5 ユニットを dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 200 μ M、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウムおよび 0.0001% ゼラチンを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.3）0.1 ml に添加し、PCR を行った。

【0106】

PCR は、94℃で90秒間、50℃で120秒間、72℃で120秒間の反応を1サイクルとして、10サイクル繰り返した後、94℃で90秒間、40℃で120秒間、72℃で120秒間の反応を1サイクルとして、10サイクル繰り返し、更に、94℃で90秒間、40℃で120秒間、72℃で180秒間の反応を1サイクルとして、20サイクル繰り返した後、72℃で360秒間反応する条件で行った。

【0107】

得られたPCR反応産物とPCR産物クローニング用ベクター pT-Adv ベクター（クローンテック社製）とを連結処理した。

該連結処理により取得したDNA 1 μ g を使い、エシェリヒア・コリ DH5 α を形質転換し、アンピシリン 100 μ g/ml を含む L 寒天培地に塗布した。

【0108】

アンピシリンに耐性となった形質転換体から、アルカリ溶菌法によりプラスミド pT-AI を抽出した。

該プラスミド pT-AI の構造を、各種制限酵素を用いて解析し、該プラスミドがグアノシンイノシンキナーゼ遺伝子（1.3 kb）、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、およびエシェリヒア・コリ由来の複製起点を有することを確認した。

【0109】

(2) グアノシンイノシンキナーゼ遺伝子の発現を炭素源によって制御可能な誘導発現プラスミド pIGK2 の造成

誘導発現ベクター pCEX2（特開平3-224259号）を用い、グアノシンイノシ

ンキナーゼ遺伝子の発現を炭素源によって制御できるプラスミドを、以下のよう
にして構築した。

【0110】

pCEX2ベクターDNA 1 μ gをKpnI (5単位)で切断し、イソシト
レートリナーゼ遺伝子の発現制御領域、転写終了シグナル領域、スペクチノマイ
シン耐性遺伝子およびコリネバクテリウム・グルタミカム由来の複製起点を含む
7.6 kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離、回収した。

【0111】

上記実施例3 (1)で得たグアノシンイノシンキナーゼ遺伝子を含むプラ
スミドpT-AI 1 μ gをKpnI (5単位)で切断した後、脱リン酸処理した。

該KpnI切断DNA断片と上記pCEX2のKpnI切断断片を連結処理し
た。

得られた連結混合液を用い、エシェリヒア・コリDH5 α を形質転換後、10
0 μ g/mlアンピシリンを含むL寒天培地上に塗布し、アンピシリン耐性とな
った形質転換株を得た。

【0112】

得られた形質転換体から、アルカリ溶菌法によりプラスミドを抽出した。

該プラスミドを各種制限酵素で切断解析した結果、図3に示した目的の構造を
有するプラスミドpIGK2を得た。

該DNA 1 μ gを用い電気パルス法によってコリネバクテリウム・アンモニ
アゲネスATCC6872株を形質転換し、スペクチノマイシン100 μ g/ml
を含むA完全培地に塗布した。

【0113】

スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラ
スミドDNAを抽出し、pIGK2を有することを確認した。

pIGK2を有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872
/pIGK2はブダペスト条約に基づいて、平成11年2月5日付けで工業技術
院生命工学技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号30

5-0046) に FERM BP-6638 号として寄託されている。

【0114】

(3) FERM BP-2217 株に pIGK2 を導入した株の有するグアノシンイノシンキナーゼ活性の測定

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872 / pIGK2 (FERM BP-6638 号) からアルカリ溶菌法によりプラスミド pIGK2 を抽出した。

【0115】

該プラスミドを用い、電気パルス法によってコリネバクテリウム・アンモニアゲネスのイノシン生産菌 FERM BP-2217 (特許番号第 2578496 号: アデニンのリーキー要求性およびグアニン要求性) を形質転換した。

スペクチノマイシンに耐性となった形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を抽出した。

【0116】

該プラスミドを各種制限酵素で切断解析し、得られた形質転換株が pIGK2 を保有していることを確認した。

pIGK2 を有するイノシン生産菌 FERM BP-2217 株をスペクチノマイシン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む A 培地および該培地のグルコースを酢酸アンモニウムに代替した培地の 2 種類の培地で、 30°C 、24 時間培養した。

【0117】

得られた培養液より、菌体を取得し、これら菌体から実施例 1 (2) に記載の方法に準じて細胞抽出液を調製した。

これら抽出液中のグアノシンイノシンキナーゼの活性を以下の方法で測定した。

予め 30°C に保温した反応液 [100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.2)、 10 mM MgSO_4 、 50 mM KCl 、 1 mM ATP 、 1 mM イノシン] 0.1 ml に細胞抽出液 0.01 ml を添加し、 30°C 、30 分間程度反応させた。

【0118】

反応の間、経時的に反応液の一部をサンプリングし、0.2M NaH_2PO_4 (H_3PO_4 でpH2.6に調整)を用い、サンプリング液を1/20に希釈して反応を停止させた。

該反応停止液中のイノシンおよびIMPの生成量を、以下のHPLC分析条件で定量した。

【0119】

HPLC分析条件

カラム: Asahipak GS-320H (旭化成社製)

溶出液: 0.2M NaH_2PO_4 (pH2.6)

流速: 1ml/min

検出: UV254nm

イノシンおよびIMPの蓄積量は、UV254nmの吸光度により測定し、吸光強度をスタンダードと比較することにより定量した。1分間に1μmolのIMPを生成させる活性を1単位(U)とし、蛋白質1mg当たりの比活性を算出した。

【0120】

蛋白量は、プロテイン・アッセイキット(バイオラッド社製)を用いて定量した。

結果を第3表に示した。グルコースを炭素源として培養した菌体では、極めて低レベルの活性しか検出されなかったのに対し、2% 酢酸アンモニウムを炭素源として培養した菌体では高レベルの活性が検出された。本結果は、pIGK2を有するFERM BP-2217株において、グアノシンイノシンキナーゼ遺伝子の発現がイソシトレートリアーゼ遺伝子のプロモーター支配下にあり、該酵素活性を炭素源によって制御できることを示している。

【0121】

【表 3】

第 3 表

炭素源	比活性 (μ mol/min/mg protein)
グルコース	0.02
酢酸アンモニウム	0.34

【0122】

(4) pIGK2を有するイノシン生産菌FERM BP-2217株によるIMPの生産

pIGK2を有するFERM BP-2217株をストレプトマイシンを20 μ g/ml含有するA寒天培地上で30℃、2日間培養した。

【0123】

培養後、得られた菌体を、60mlのストレプトマイシンを20 μ g/ml含有するCIシード培地〔グルコース 5%、酵母エキス 1%、ペプトン 1%、NaCl 0.25%、尿素 0.25%、アデニン 300mg/l、グアニン 100mg/l (pH7.2)〕を添加した250ml容三角フラスコに植菌し、30℃、24時間浸とう培養した。

【0124】

得られた培養液全量を、0.94LのDIシード培地〔グルコース 7%、肉エキス 1%、ペプトン 1%、 KH_2PO_4 0.1%、 K_2HPO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、アデニン 300mg/l、グアニン 300mg/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 10mg/l、 β -アラニン 16mg/l、L-システイン 20mg/l、ビオチン 30 μ g/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2mg/l、チアミン 6mg/l (pH7.2)〕を添加した2L容発酵槽に植菌し、5.5Mアンモニア水でpHを7.2に保ちつつ、30℃、攪拌600rpm、通気1L/minの条件で24時間培養した。

【0125】

得られた培養液 120 ml を、0.88 L の F I 発酵培地〔グルコース 8%、CSL 2.07%、 KH_2PO_4 0.21%、 K_2HPO_4 0.21%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.43%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 105 mg/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.4 mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20.7 mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.2 mg/l、パントテン酸カルシウム 10.4 mg/l、L-システイン 20.7 mg/l、ニコチン酸 5.2 mg/l、ビオチン 93.8 μg /l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.51 mg/l、アデニン 313 mg/l (pH 7.2)〕を添加した 2 L 容発酵槽に植菌し、5.5 M アンモニア水で pH 7.2 に保ちつつ、28℃、攪拌 600 rpm、通気 1 L/min の条件で 44 時間培養した。

【0126】

培養終了後、該培養上清中のイノシンおよび IMP の生成蓄積量を実施例 3 (3) に記載の方法に準じて定量した。

培養上清中のイノシンの生成蓄積量は、23.1 g/l であり、IMP は検出されなかった。

【0127】

培養終了後、グアノシンイノシンキナーゼ遺伝子を誘導発現させるために、酢酸アンモニウムを最終濃度が 2% になるように添加し、5.5 M アンモニア水で pH 7.2 に保ちつつ、攪拌 600 rpm、通気 1 L/min の条件で 10 時間培養を継続した。

【0128】

得られた培養液に、グルコース 2.5%、フィチン酸 10 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.4 g/l、 Na_2HPO_4 9.36 g/l、アデニン 96.9 mg/l、ナイミーン S-215 10 g/l を添加した後、5.5 M アンモニア水で pH を 7.4 に保ちつつ、40℃、攪拌 600 rpm、通気 1 L/min の条件で 24 時間反応を行った。

【0129】

反応後、反応上清中の IMP の蓄積量を実施例 3 (3) に記載の方法に準じて定量した。

37. 7 g/l の IMP が反応液中に生成蓄積されていた。

【0130】

【発明の効果】

本発明により、調味料として大きな需要のあるプリンヌクレオチドを同一発酵槽内で効率よく製造するための製造法および該製造法に用いることのできる微生物を提供することができる。

【0131】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> A METHOD OF PRODUCING PRINNUCLEOTIDE

<130> H10-1422N2

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0 1 3 2】

<210> 1

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

ccgcggctta aggaagttac ctgtgtgact caacctgcaa caactcc

47

【 0 1 3 3 】

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

aaaggatcct agaagtttta ctcccactcg atggttcccg

40

【 0 1 3 4 】

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

ccgcggctta aggaagtgc tttgatgaaa tttcccgta aacgtaa

47

【 0 1 3 5 】

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

aaaggatcca cgataactta acgatcccag taagactctt

40

【 0 1 3 6 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : 合成 DNA

配列番号 2 : 合成 DNA

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、プラスミド p L A C 8 5 7 の構造を示す図である。

【図 2】 図 2 は、プラスミド p G U A 2 の構造を示す図である。

【図 3】 図 3 は、プラスミド p I G K 2 の構造を示す図である。

【符号の説明】

P_L : P_L プロモーター

guaA : エシェリヒア・コリ由来の XMP アミナーゼ遺伝子

C.glt ORI : コリネバクテリウム・グルタミカム複製起点

Spc^r : スペクチノマイシン耐性遺伝子

cl857 : 温度感受性リプレッサー遺伝子

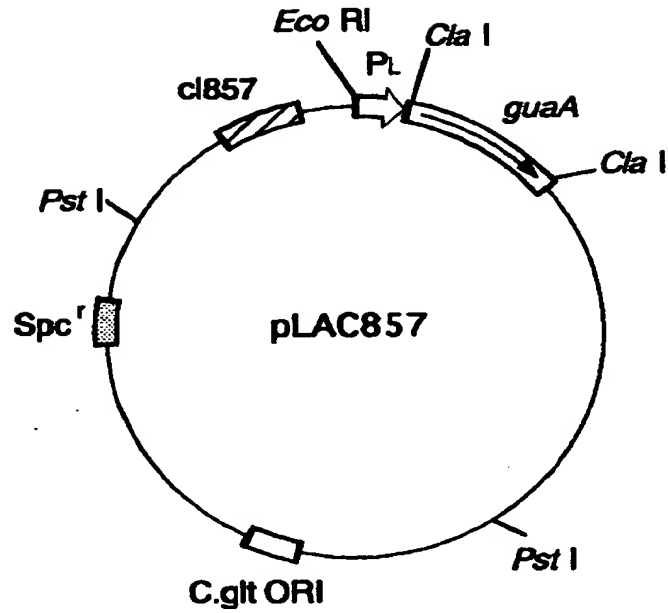
P_{ICL} : コリネバクテリウム・グルタミカム由来のイソシトレートリアーゼ遺伝子発現制御領域

T_{ICL}: コリネバクテリウム・グルタミカム由来のイソシトレートリアーゼ遺伝子ターミネーター

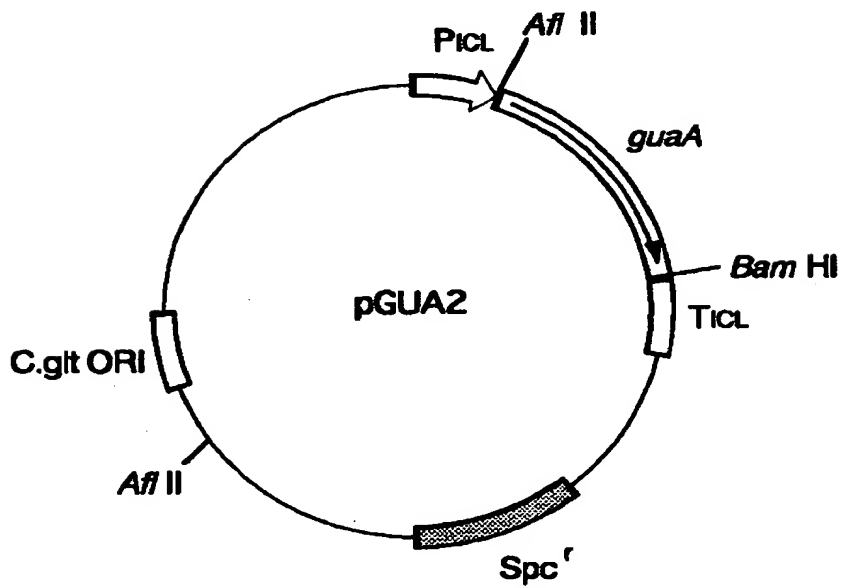
igk: エシェリヒア・コリ由来のイノシングアノシンキナーゼ遺伝子

【書類名】 図面

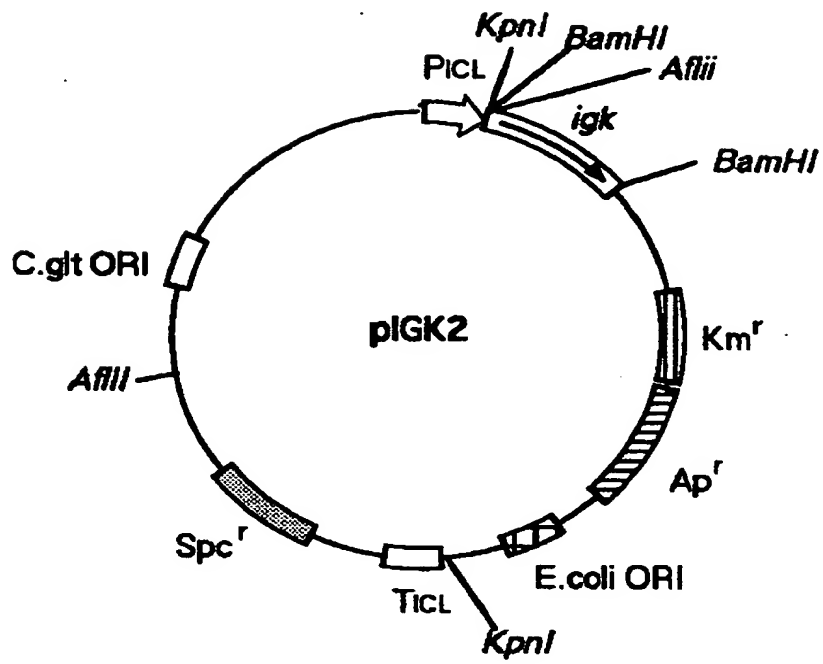
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 同一発酵槽内で効率よくヌクレオチドを製造するためのプロセスの開発を課題とする。

【解決手段】 本発明によれば、プリンヌクレオチドの前駆物質を生産する能力を有し、かつ該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成可能な酵素を誘導発現することのできるDNAを導入した微生物を培地に培養し、該培養物中にプリンヌクレオチドの前駆物質を生成蓄積させた後、該前駆物質よりプリンヌクレオチドを合成することのできる酵素を誘導発現させ、該培養物中に該前駆物質よりプリンヌクレオチドを生成蓄積させ、該培養物中より該プリンヌクレオチドを採取することを特徴とする、プリンヌクレオチドの製造法および該製造法において用いることのできる微生物を提供することができる。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補足書

【提出日】 平成11年 2月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第 29738号

【補足をする者】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【補足対象書類名】 特許願

【補足の内容】 原寄託についての受託証（写）を提出する。

【提出物件の目録】

【物件名】 原寄託についての受託証（写） 2

国際様式 INTERNATIONAL FORM



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 協和醗酵工業株式会社
取締役社長 平田 正 殿

寄託者

あて名 〒 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

29902700204



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872/p1GK2	(受託番号) FERM BP- 6638
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 11 年 2 月 5 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology 所長 大澤 信子 Dr. Shinozaki Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市 1-3-1 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 11 年 (1999) 2 月 5 日	

国際様式 INTERNATIONAL FORM



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 協和醗酵工業株式会社
取締役社長 平田 正 殿
寄託者 あて名 〒 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872/pLAC837	(受託番号) FERM BP- 6639
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 11 年 2 月 5 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Bioscience and Human-Technology 名称: Agency for Industrial Science and Technology 所長 大賀 信 Dr. Shinobu O贺: Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 11 年 (1999) 2 月 5 日	

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第029738号
受付番号	29902700204
書類名	手続補足書
担当官	市川 勉 7644
作成日	平成11年 5月19日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	原寄託についての受託証（写）	1.
---------	----------------	----

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社